

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JONATHAN PEREIRA

EFICÁCIA DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) E *Bonagota salubricola* (MEYRICK, 1937) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS POR MEIO DE BIOENSAIOS E INFRAVERMELHO PRÓXIMO

CURITIBA

2012

JONATHAN PEREIRA

EFICÁCIA DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) E *Bonagota Salubricola* (MEYRICK, 1937) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS POR MEIO BIOENSAIOS E INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lino Bittencout Monteiro

Co-orientador: Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez

CURITIBA

2012

Pereira, Jonathan

EFICÁCIA DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) E *Bonagota salubricola* (MEYRICK, 1937) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS POR MEIO BIOENSAIOS E INFRAVERMELHO PRÓXIMO /Jonathan Pereira. – Curitiba, 2012. 61f.

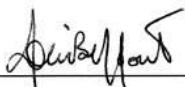
Orientador: Lino Bittencourt Monteiro

Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

JONATHAN PEREIRA

"EFICÁCIA DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE *Grapholita molesta*
(BUSCHK, 1916) E *Bonagota salubricola* (MEYRICK, 1937)
(LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS POR
MEIO DE BIOENSAIOS E INFRAVERMELHO PRÓXIMO"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Mestre
em Ciências Biológicas", no Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal
do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



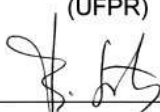
Prof. Dr. Lino Bittencourt Monteiro (Orientador)
(UFPR)



Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk
(UNESP)



Prof. Dr. Mário Niewelowski Filho
(UFPR)



Prof. Dr. Bráulio Santos
(UFPR)

Curitiba, 27 de fevereiro de 2011.

Aos meus pais Mário Pereira e Hildenev Terezinha Jaskiu,

Aos meus irmãos,

E minha querida Ana,

Por sempre me incentivarem e estarem ao meu lado em quase todos os momentos,

Dedico.

À Universidade Federal do Paraná e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Entomologia pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Dr. Lino Bittencourt Monteiro pela amizade e confiança depositada em mim.

Ao Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez pelas sugestões essenciais para melhoria do trabalho.

Aos professores da pós-graduação em Entomologia pelos incentivos e conhecimentos compartilhados.

Aos meus colegas de laboratório Rosangela; Magda; Priscila; Frederico; Carol; Cadu; Rafael; Estefano; Rebeca; Débora; Pedro; Gabriel; Patrícia; Marieli; Suzane; Henrique; Aline; Jordana e Marcel que direta ou indiretamente corroboraram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
Capítulo I.....	7
Mortalidade e desenvolvimento de lagarta-enroladeira-da-maçã expostas a três bioinseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> em laboratório.....	7
Resumo.....	8
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão.....	11
Conclusão.....	14
Referências.....	14
Tabelas.....	17
Capítulo II.....	20
Eficácia de subespécies de <i>Bacillus thuringiensis</i> no controle de <i>Grapholita molesta</i> (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) e efeito sobre o desenvolvimento larval.....	20
Resumo.....	21
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados e Discussão.....	24
Agradecimentos.....	26
Referencias.....	26
Tabelas.....	29
Figuras.....	31
Capítulo III.....	32
Biótipos de <i>Grapholita molesta</i> (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) caracterizados por infravermelho próximo e suscetibilidade a <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	32
Resumo.....	33
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	35
Resultados e Discussão.....	37
Referencias.....	39
Tabelas.....	42
Figuras.....	43

EFICÁCIA DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) E *Bonagota salubricola* (MEYRICK, 1937) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS POR MEIO BIOENSAIOS E INFRAVERMELHO PRÓXIMO

RESUMO - *Grapholita molesta* e *Bonagota salubricola* são pragas principais pragas de macieira (*Malus domestica*, Borkh). Os danos são causados pelas larvas que inviabilizam a comercialização e o consumo in natura de frutos. O método de controle mais comum para estes tortricídeos é químico, sendo uma alternativa de menor impacto ambiental o uso de microrganismos entomopatógenos. O objetivo deste trabalho foi testar a eficácia de controle em períodos diferentes de avaliação de mortalidade para *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk, Dipel®), *B. thuringiensis aizawai* (Bta, Xentari®) e transconjugado *B. thuringiensis aizawai* x *kurstaki* (Btak, Agree®) no controle *G. molesta* e *B. salubricola*, comparar a eficácia entre *Bacillus* e verificar a ocorrência de biótipos de *G. molesta* através de infravermelho próximo e bioensaios com Btk utilizando cinco populações. As populações de ambos os insetos foram coletadas no campo e mantidas em dieta artificial. Os bioensaios foram realizados utilizando microplacas. Em cada poço da placa foram aplicados cerca de 150µl de dieta artificial, esta foi compactada para manter a superfície plana. Em seguida foram adicionados 6µl de calda sobre a dieta contendo os três *Bacillus*. Foram utilizadas sete concentrações mais uma testemunha com aplicação de água. Após aproximadamente 20 minutos foi colocada uma larva neonata por poço da placa e em seguida a mesma foi fechada com parafilme. As placas com larvas de *B. salubricola* foram mantidas em estufa com fotoperíodo (Eletrólabs) com UR 60 ± 10%, temperatura de 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 horas, para larvas de *G. molesta*, as placas foram mantidas com UR 60 ± 10%, temperatura de 21 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas. A mortalidade de *B. salubricola* foi registrada sete, dez e quinze dias após tratamento e para *G. molesta* a sete e dez dias. A eficácia de controle entre *Bacillus* foi comparada ao décimo dia para as duas espécies. Simultaneamente a verificação da morte das larvas foram registrados os instares em que as larvas se encontravam através da contagem das capsulas cefálicas. Para verificação de suscetibilidade de *G. molesta*, a mortalidade nas cinco populações foi registrada ao décimo dia após tratamento. A diferenciação dos cinco biótipos de *G. molesta* foi realizada através de leituras das pupas com infravermelho próximo (NIR). Os resultados encontrados indicam que nas condições experimentais a qual às larvas foram submetidas o décimo dia foi ideal para avaliação de mortalidade para *B. salubricola* e *G. molesta*. *B. thuringiensis kurstaki* foi mais eficaz no controle de *B. salubricola*, para *G. molesta* *B. thuringiensis kurstaki* e *B. thuringiensis aizawai* x *kurstaki* foram mais eficientes, não diferindo estatisticamente. O desenvolvimento larval das duas espécies foi afetado por doses subletais dos três *Bacillus* em relação a testemunha. Foi possível diferenciar as cinco populações de *G. molesta* através de infravermelho próximo, entretanto, com os bioensaios dois grupos foram formados.

Palavras-chaves: Controle microbiano, mariposa oriental, lagarta-enroladeira.

EFFICIENCY OF CONTROL THE *Bacillus thuringiensis* IN *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) AND *Bonagota salubricola* (MEYRICK, 1937) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) IDENTIFICATION AND BIOTYPE THROUGH BIOASSAY AND NEAR INFRARED

ABSTRACT - *Grapholita molesta* and *Bonagota salubricola* are among the major pests of apple. The damage is caused by larvae that make it impossible commercialization and consumption of in nature fruit. Tortricideos the most common control method is chemicals an alternative with less environmental impact the use of entomopathogenic microorganisms. The objective of this work was to verify the effectiveness of control in different periods of evaluation of mortality for *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Dipel ®), *B. thuringiensis aizawai* (Xentari ®) and transconjugado *B. thuringiensis kurstaki* x *aizawai* (Agree ®) in controlling *G. molesta* and *B. salubricola*, compare the efficacy between *Bacillus* and verify the selection of biotypes of *G. molesta* through near-infrared and bioassays with Btk using five populations. The populations of both insects were collected in the field and maintained on artificial diet. Bioassays were conducted using microplates. In each well of the plate was placed approximately 150µl of artificial diet, it was compacted to keep the surface flat. Were then added 6µl of solution on the diet containing the three *Bacillus*. We used seven concentrations and a control with application of water. After approximately 20 minutes was released a one neonate larvae in each well of the plate, then they were closed with parafilm. For larvae of *B. salubricola* The plates were kept at (Eletrolab mod. 112FC), RH 60 ± 10%, temperature 24 ± 2 ° C for larvae of *G. molesta*, the plates were kept at temperature of 21 ± 2 ° C. The mortality of *B. salubricola* was recorded at seven, ten and fifteen days after treatment and *G. molesta* to seven to ten days. Efficacy of control between *Bacillus* was compared to the tenth day for both species. At the same time checking the mortality was registered in which the larvae instars were by counting the cephalic capsules. To verify the susceptibility of *G. molesta* mortality in five populations was observed on the tenth day after treatment. The results indicate that in larvae submitted to the experimental conditions, the tenth day was ideal for evaluation of mortality in *B. salubricola* and *G. molesta*. Btk was more effective in controlling *B. salubricola* to *G. molesta*, Btk and Btak were more efficient, without statistical differences. Larval development of the two species was affected by sublethal doses of three *Bacillus* compared the witness. It was possible to distinguish five populations of *G. molesta* using near-infrared and bioassays with Btk.

Key-words: Microbial control, oriental fruit moth, apple-leafroller.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Em frutíferas de clima temperado ocorrem dois lepidópteros da família Tortricidae de importância econômica, mariposa oriental, *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) e lagarta enroladeira-da-maçã, *Bonagota salubricola* (MEYRICK, 1937) (Allen, 1958, Bentancourt & Scatoni, 1995).

A mariposa oriental está disseminada nas principais regiões produtoras de maçã do Brasil (Botton *et al.*, 2000, Hickel *et al.*, 2003). Os adultos possuem hábito crepuscular, período que coincide com a maior parte da atividade reprodutiva, vôo diário e oviposição (Moraes *et al.*, 2009). A temperatura influencia na postura das fêmeas, a 22° C a oviposição ocorre mais cedo, porém, a temperatura de 19°C há maior número de ovos (Silva & Monteiro, 2011). As fêmeas apresentam preferência por ovipositar em frutos danificados anteriormente por *G. molesta*, os ovos são colocados em geral nas áreas próximas ao receptáculo floral e haste do fruto, local onde as larvas neonatas procuram penetrar os frutos indiferente da origem (Myers *et al.*, 2006). As larvas podem perfurar ramos jovens da planta e se alimentar da região de meristema apical (Souza *et al.*, 2000), contudo, o maior prejuízo ocorre quando causam queda ou inviabilização para consumo (Salles, 1991).

A lagarta enroladeira-da-maçã é considerada uma praga secundária que surgiu nos pomares brasileiros na década de 90 (Kovaleski *et al.*, 1998). As fêmeas colocam os ovos em massas contendo aproximadamente 40 ovos. As larvas em macieira se alimentam da epiderme de folhas e frutos (Bentancourt *et al.*, 2004), contudo, os danos são significativos quando se alimentam de frutos (Botton *et al.*, 2000).

O método de controle mais comum para estes tortricídeos é o químico, principalmente com inseticidas Organofosforados e Piretróides. Entretanto há necessidade de substituição destes grupos químicos, devido sua toxicidade a inimigos naturais cosmopolitas (Yamamoto & Bassanezi, 2003). Arioli *et al.* (2004) estudaram o controle de *G. molesta* com grupos químicos menos tóxicos a mamíferos (Avermectinas, Spinosinas) e alcançaram resultados satisfatórios em pomares de pêssego. Botton *et al.* (2009), testaram vários grupos químicos no

controle de *B. salubricola*, verificando que Diacilhidrazinas são alternativas de menor impacto ambiental para o controle.

O emprego de inimigos naturais é pouco aplicado, embora Monteiro (2004) e Pastori *et al.* (2008) tenham estudado o uso do parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *B. salubricola*. Outro método biológico com potencial são microrganismos entomopatogênicos (Ali *et al.*, 2010, Jacas & Urbaneja, 2008).

No Brasil três subespécies *Bacillus thuringiensis* (Bt) são mais comercializadas: Bt *kurstaki* (Btk), Bt *israelensis* (Bti) e Bt *aizawai* (Bta). O Btk é usado no controle de lepidópteros na agricultura e silvicultura, Bti é importante no controle de dípteros vetores na saúde pública (Charnley, 1991), e Bta tem efeito em ambos os grupos de insetos (Smith *et al.*, 1996).

O primeiro cientista a isolar a bactéria entomopatogênica Bt foi Ishiwata em 1902, a partir de larvas do bicho-da-seda, *Bombix mori* L., nomeando-a de “sotto disease bacillus” (Alves, 1998). Em 1911, Berliner isolou um bacilo de larvas mortas da traça do trigo, *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), e verificou que a bactéria seria o agente etiológico da doença nesse inseto. Ele descreveu a existência de inclusões cristalinas no interior das células esporuladas do bacilo.

Uma das características de Bt são os esporos em formatos elípticos e cilíndricos, com um esporângio não nitidamente estendido e presença de um cristal de proteína intracelular de ação inseticida, sintetizado durante a esporulação (Alves, 1998). A ação inseticida do Bt ocorre através de proteínas denominadas Cry, presentes no cristal, estas são sintetizadas durante a esporulação e codificadas pelos genes *cry* (Knaak & Fiuza, 2006).

Uma das limitações do uso de Bt é sua sensibilidade à radiação UV (ultravioleta), que diminui sua velocidade de ação, podendo ser degradado até 50% dos esporos de um a três dias (Joung & Côté, 2000). O *Bacillus* Pode sofrer inativação com o efeito das variáveis, temperatura, orvalho e chuvas (Mcguire & Shasha, 1990), sendo os cristais de proteínas mais resistentes à radiação que os esporos (Polanczyk & Alves, 2003).

Organismos não-alvos podem ser expostos ao Bt diretamente através da alimentação com larvas contaminadas ou indiretamente com a ingestão de folhas e camadas superficiais do solo.

Em abelhas não há relatos de efeitos adversos sobre colônias que foram expostas a pulverizações de Bt a campo (Joung & Côté, 2000). Porém, em estudos sobre efeitos em adultas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), realizado em laboratório, o Btk provocou mortalidade da maioria dos indivíduos (Brighenti *et al.*, 2007).

No solo, Polanczyk (2003) descreveu que as toxinas são unidas a ácidos húmicos e partículas, isto as protegem da degradação por microrganismos, não perdendo sua ação inseticida e tendo uma meia vida em torno de 100 a 200 dias. O Bt pode se multiplicar em microhabitats, como solos férteis, no entanto ocorre baixa epizootia (Polanczyk, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi verificar em diferentes períodos de avaliação de mortalidade, a eficácia de *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Dipel®), *B. thuringiensis aizawai* (Xentari®) e transconjugado *B. thuringiensis aizawai* x *kurstaki* (Agree®) no controle de *G. molesta* e *B. salubricola*, comparar a eficácia entre Bts, verificar a seleção de biótipos de *G. molesta* através de infravermelho próximo e bioensaios com Btk utilizando cinco populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S., ZAFAR, Y., MUHAMMAD ALI, G., NAZIR, F. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**. V. 9, n.14, p. 2022-2031, 2010.

Allen, H. W. The oriental fruit moth. U.S. Dep. Agric., Agric. Inf. Bull. No. 182, 1958.

ALVES, B. S. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed, v 4, Piracicaba: Fealq, 1998.

ARIOLI, J. C.; BOTTON, M.; CARVALHO, G. A. Controle químico da *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura do pessegueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.6, p.1695-1700, nov-dez, 2004.

BENTANCOURT, C. M., SCATONI, I. B. **Lepidópteros de importancia económica, reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales.** Montevideo, Hemisferio Sur - Facultad de Agronomía, v., 1124 p, 1995.

BENTACOURT, C. M., SCATONI, I. B., GONZALES, A., FRANCO, J. Biology of *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) on seven natural foods. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 299-306, 2004.

BOTTON, M.; NAKANO, O.; KOVALESKI, A. CONTROLE QUÍMICO DA LAGARTA-ENROLADEIRA (*Bonagota Cranaodes* MEYRICK) NA CULTURA DA MACIEIRA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2139-2144, nov. 2000.

BOTTON, M.; ARIOLI, J. C.; RINGENBERG, R.; MORANDI FILHO, J. W. Controle químico de *Bonagota Salubricola* (MEYRICK, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório e pomar de macieira. **Arquivos do instituto biológico**, São Paulo, v.76, n.2, p.225-231, 2009.

BRIGHENTI, M. D.; CARVALHO, F. C.; CARVALHO, A. G.; BRIGHENTI, G. R. C.; CARVALHO, M. S. BIOATIVIDADE DO *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) PARA ADULTOS DE *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 279-289, 2007.

CHARNLEY, K. A. A Review Microbial pathogens and insect pest control. **Letters in Applied Microbiology**, v.12, p. 149-157, 1991.

HICKEL, R. E., RICKEL, R. G.; SOUZA, F. F. O.; VILELA, F. E.; MIRAMONTES, O. Dinâmica populacional da mariposa oriental em pomares de pessegueiro e amexeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 325-337, 2003.

JACAS, J. A., URBANEJA, A. **Control Biológico de Plagas Agrícolas.** Valencia: M. V. Phy, 2008.

JOUNG, K.; CÔTÉ, J. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Horticultural Research and Development Centre**, Technical Bulletin n. 29, 2000.

Knaak, N., Fiúza, L. D. Genes cry1Ab e cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* e proteínas com potencial na agrobiotecnologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 36, 2006.

KOVALESKI, A.; BOTTON, M.; EIRAS, A.E.; VILELA, E. **Lagarta-enroladeira da macieira: bioecologia e controle**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 22p. (Embrapa-CNPUV. Circular Técnica, 24), 1998.

MCGUIRE, M. R.; SHASHA, B. S. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 1813-1817, 1990.

MONTEIRO, L. B.; SOUZA, A.; BELLI, E. L.; SIVA, R. B. Q.; ZUCCHI, R. A. Ocorrência de *Trichogramma pretiosum* RILEY (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Bonagota cranaodes* (MEYRICK) (Lepidoptera: Tortricidae) em macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 1, p. 171-172, 2004.

MORAIS, R. M., REDAELLI, L. R., SANT'ANA, J. Anatomia comparada dos órgãos internos de reprodução de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae). **Biotemas**, n. 22, p. 59-67, 2009.

MYERS, C. T., HULL, L. A., KRAWCZYK, G. J. Seasonal and Cultivar-Associated Variation in Oviposition Preference of Oriental Fruit Moth (Lepidoptera: Tortricidae) Adults and Feeding Behavior of Neonate Larvae in Apples. **Journal of Economic Entomology**, n.99, p. 349-358, 2006.

PASTORI, P. L.; MONTEIRO, L. B.; BOTTON, M.; SOUZA, A.; POLTRONIERI, A. S.; SCHUBER, J. M. Parasitismo de ovos da lagarta-enroladeira-da-maçã em função do número de *Trichogramma pretiosum* RILEY (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Liberado. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.4, p.497-504, 2008.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: UMA BREVE REVISÃO. **Agrociencia** v. 7, p. 1-10, 2003.

SALLES, L. A. B. **Grapholita (Grapholita molesta): bioecologia e controle**. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 13p. (Documentos, 42), 1991.

SILVA, E. D. B., MONTEIRO, L. B. Oviposição on Behavior of *Grapholita molesta* Busck (Lepidoptera: Tortricidae) at Different Temperatures. **Neotropical Entomology**, n.40, p. 415-420, 2011.

SMITH, G. P., MERRICK, J. D., BONE, E. J., ELLAR, D. J. Mosquitocidal Activity of the CryIC d-Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 680-684, 1996.

SOUZA, B.; SANTA-CECÍLIA, C. V. L.; SOUSA, V. O. L. Ocorrência e Danos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em Pessegueiros no Município de Caldas, MG. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p.185-188, 2000.

YAMAMOTO, P. T., BASSANEZI, R. B. Seletividade de produtos fitossanitários aos inimigos naturais de pragas do citrus. **Laranja**, Cordeirópolis, v.24, n.2, p.353-382, 2003.

Capítulo I

Mortalidade e desenvolvimento de lagarta-enroladeira-da-maçã expostas a três bioinseticidas de *Bacillus thuringiensis* em laboratório

Mortalidade e desenvolvimento de lagarta-enroladeira-da-maçã exposta a três bioinseticidas de *Bacillus thuringiensis* em laboratório*

Jonathan Pereira ⁽¹⁾; Lino Bittencourt Monteiro ⁽²⁾ e Daniel Ricardo Sosa Gomez ⁽³⁾.

⁽¹⁾Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia/Ciências Biológicas/Entomologia, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Cx. Postal: 19.020, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: jonathanpereira@yahoo.com.br ⁽²⁾Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitossanidade, Rua dos Funcionários, n.1540, CEP 80035-050, Juvevê, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: lbmonteiro@terra.com.br ⁽³⁾Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rod. Carlos João Strass, acesso Orlando Amaral, Warta, CEP 86001-970, Londrina, PR, brasil. E-mail: drsg@cnpso.embrapa.br.

Resumo - *Bacillus thuringiensis* (Bt) é o entomopatógeno mais comercializado mundialmente. Objetivou-se com este estudo comparar a eficácia de controle de *B. thuringiensis kurstaki*, *Bacillus thuringiensis aizawai* e o transconjugado *Bacillus thuringiensis aizawai* x *kurstaki* em diferentes períodos de avaliação de mortalidade e influência sobre desenvolvimento larval de *Bonagota salubricola*. Os insetos foram criados em dieta artificial. Para os bioensaios foram utilizados microplacas contendo 150 µl de dieta em cada poço. As soluções contendo as subespécies de Bt foram depositadas na superfície da dieta, em seguida foi liberada uma larva neonata, totalizando 24 em cada concentração. Foram utilizadas sete concentrações, mais uma referência onde foi aplicada água. A mortalidade foi avaliada ao sétimo, décimo e décimo quinto dia após tratamento. Em todas as concentrações foi verificado o instar larval. Para as três subespécies a maior mortalidade foi registrada aos quinze dias após tratamento. Bt *kurstaki* foi mais eficaz no controle ao sétimo e décimo dia avaliação, exceto aos quinze dias onde foi semelhante a Bt *aizawai*. Avaliações acima de sete dias foram mais eficientes para determinar a mortalidade. As três subespécies influenciaram na capacidade de mudança de instar, indiferente da concentração. A CL₅₀ de Bt *kurstaki* nos três períodos de avaliação foi duas a cinco vezes menores que Bt *aizawai* x *kurstaki* e Bt *aizawai*, respectivamente.

Termos para indexação: *Bonagota salubricola*, Macieira, Entomopatógeno.

¹Mortality and development of apple leafroller exposed to the three subspecies of *Bacillus thuringiensis* subspecies in laboratory

Abstract - Bacterium *Bacillus thuringiensis* is the most marketed worldwide entomopathogen. The objective this study was compares the effectiveness control of *B. thuringiensis kurstaki*, *aizawai* and hybrid *aizawai* x *kurstaki* in different periods of mortality assessment and influence of larval development of *B. salubricola*. The experiments were conducted on artificial diet. Mortality was assessed on the seventh,

*Formatação, Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

tenth and fifteenth days after treatment. At all concentrations there was the larval stage. We used microplates containing 150 µl of diet in each cell. The concentration containing the Bt subspecies was deposited on the surface of the diet, then released a neonate larvae, for a total of 24 concentration. The mortality assessment performed after fifteen days of treatment was significant for all three subspecies. Bt *kurstaki* was more efficient in all assessment periods, except for fifteen days which was similar to Bt *aizawai*. Assessments were up seven days more efficient to determine the mortality. The three subspecies have influenced the ability to call for change, regardless of the concentration. The LC₅₀ of Bt *kurstaki* in the three assessment periods was two to five times smaller than Bt *aizawai* x *kurstaki* e Bt *aizawai*, respectively.

Index terms: *Bonagota salubricola*, apple tree, entomopathogen.

Introdução

A bactéria entomopatogênica, *Bacillus thuringiensis* (Bt) produz cristais de pró-toxinas durante a esporulação (ALVES, 1998). A propriedade inseticida foi reconhecida em 1911 e sua utilização comercial ocorreu na França em 1938 (JOUNG e CÔTÉ, 2000), para o controle de *Anagasta kuehniella* (ZELLER) (Lepidoptera: Piralidae). Entretanto, as primeiras formulações com Bt não foram bem sucedidas (JOUNG e CÔTÉ, 2000).

A evolução das técnicas de fermentação e isolamento de novas subespécies permitiu o surgimento de novas formulações eficiente para o controle de lepidópteros contendo as subespécies *kurstaki* (Btk) e *aizawai* (Bta). Esses possuem o pH do mesêntero ideal para promover a ação das proteases que ativam a toxina (TERRA, 1990; BULUSHOVA et al., 2011), causando a infecção das larvas.

No Brasil, Btk é usado para o controle de *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em macieira. A ação inseticida desta subespécie afeta outros lepidópteros que ocorrem simultaneamente (MONTEIRO e SOUZA, 2010), como lagarta-enroladeira-da-maçã, *Bonagota salubricola* (MEYRICK, 1937) (Lepidopetera: Tortricidae).

O efeito causado por Bt difere de acordo com a subespécie, as quais produzem pró-toxinas específicas que agem de maneira diferente sobre o inseto. Formulações contendo duas subespécies de Bt, *aizawai* x *kurstaki*, foram elaboradas

para ampliar a eficiência. Schesser et.al (1977) mostrou que a mortalidade de larvas pode variar de acordo com o tempo de exposição. O período de avaliação dos bioensaios de lepidópteros difere entre os autores, variando de três (JYOTI e BREWER, 1999), cinco dias (BONCHEVA et al., 2006), sete dias (ARANDA et al., 1996;) e dez dias (SCHESSER e BULLA, 1978).

O objetivo deste estudo foi comparar a eficácia de *B. thuringiensis kurstaki*, *B. thuringiensis aizawai* e o transconjugado *B. thuringiensis aizawai* x *kurstaki* em diferentes períodos de avaliação de mortalidade no controle de *B. salubricola* em dieta artificial e verificar a influência sobre o desenvolvimento larval.

Material e Métodos

***Bonagota salubricola*.** A população foi coletada em pomar comercial de macieira de Porto Amazonas-PR em 2009. As larvas foram criadas em tubos (80mm x 25mm), contendo dieta artificial (PARRA, 1995). As pupas foram mantidas em estufa com fotofase de 14 horas, temperatura $24 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R de $60 \pm 10\%$ até emergência dos adultos. Estes foram liberados em gaiolas (35cm x 35cm x 35cm), contendo tiras de polietileno para oviposição.

Bioensaios. Foram utilizados *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) (Dipel WG, Abbott Laboratories, IL, EUA), *B. thuringiensis aizawai* (Bta) (Xentari WG, Abbott Laboratories, IL, EUA) e *B. thuringiensis* transconjugado *kurstaki* x *aizawai* (Btak) (Agree WP, Certis, SC, EUA). Todas as concentrações foram utilizadas em ppm (Btk – 248,5; 118,3; 56,3; 26,8; 12,7; 6,0; 2,8; Bta – 280,0; 155,5; 86,4; 48,0; 26,6; 14,8; 8,2; Btak – 190,0; 118,7; 74,2; 46,3; 28,9; 18,1; 11,3). Microplacas com 96 poços receberam 150µl de dieta artificial (Soybean-Wheat, Stonefly Industries, TX, EUA). Em cada poço foi adicionado 6 µL de solução de Bt sobre a dieta. Cada poço recebeu uma neonata com até três horas da eclosão, cerca de 20 minutos após a adição do Bt. Foram testadas três replicas com 24 indivíduos em cada concentração e no controle. Os poços foram fechados com papel parafinado (Parafilm, Chicago, IL, EUA) para evitar a fuga das larvas e desidratação da dieta. As microplacas foram mantidas em BOD (Eletrolab, mod. 112FC), UR $60 \pm 10\%$, temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$,

fotofase de 14 horas. Foram testadas sete concentrações de *Bacillus* mais uma referencia com água destilada, a partir de bioensaios preliminares. As mortalidades foram corrigidas por Abbott (1925), normalizadas por arco seno e submetidas a análise fatorial (ZAR, 1974). As medias foram comparadas por Tukey ($p < 0,05$) (Software Assisat Beta 7.6). As mortalidades registradas nos três períodos de avaliação foram submetidas a análise de Probit (Finney, 1971) (PoloPlus 1.0, Software LeOra, 2003).

Período de avaliação da mortalidade. As mesmas larvas utilizadas para o bioensaio foram observadas em três períodos de avaliação (PA): sete (PA7), dez (PA10) e quinze dias (PA15) após a aplicação de Bt. Ao PA7 foi retirado o parafilme para verificar o estado da larva e posteriormente fechado o poço. O mesmo aconteceu para PA10 e PA15. Considerou-se morta as larvas que não reagiram ao toque de um estilete. As mortalidades corrigidas e normalizadas foram submetidos a análise fatorial (ZAR, 1974). As médias foram comparadas por Tukey considerando significância $p < 0,05$.

Desenvolvimento de larvas sobreviventes. Simultaneamente ao PA, foi registrado os instares larvais em todas as concentrações através da contagem das capsulas cefálicas.

Resultados e Discussão

Bioensaios. Os resultados obtidos mostraram que a subespécie *kurstaki* foi estatisticamente mais eficaz no controle de *B. salubricola* nos três períodos de avaliação (PA7 $df= 2$, $F= 109,06$, $p < 0,001$; PA10 $df= 2$, $F= 21,25$, $p < 0,001$; PA15 $df= 2$, $F= 77,05$, $p < 0,001$) (Tabela. 1), exceção quando comparadas com Bta aos quinze dias. No PA7 a CL_{50} de Btk foi duas vezes e meia menor que Btak e quatro vezes menor que Bta (Tabela. 2). No PA10 Btk foi duas vezes menor que Btak e aproximadamente cinco vezes menor que Bta e no PA15 a CL_{50} de Btk foi cinco inferior vezes a de Btak e Bta. Para *B. salubricola* Btk foi mais eficiente no controle, isto pode estar relacionado com a origem da população, insetos resistentes ou suscetíveis expostos a Bt apresentam respostas de mortalidades distintas (FRANKLIN et al., 2009). Diaz-Gomez et al. (2000), testaram as três subespécies em

populações de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e os resultados foram semelhantes, com Btk apresentando CL_{50} muito inferior em relação a Btak e Bta. Em avaliações de injúrias em folhas causadas por *Tuta absoluta*, Btk foi cinco vezes mais eficiente que Bta (GONZÁLEZ-CABRERA et al., 2011), corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Período de Avaliação. A eficácia de controle das três subespécies *B. thuringiensis* em *B. salubricola* foi influenciada pelo período de avaliação (Tabela 1) (Btak $df= 2$, $F= 41,75$, $p < 0,001$; Btk $df= 2$, $F= 28,30$, $p < 0,001$; Bta $df= 2$, $F= 25,31$, $p < 0,001$). O PA aos quinze dias teve a maior mortalidade em todas as subespécies. Na formulação Bta observou-se que a mortalidade aos quinze dias é 2,2 vezes maior do que a obtida ao sétimo dia, quando as larvas encontram-se nos três primeiros instares consumindo pouca dieta e formando galerias superficiais (J. Pereira, dados não publicados). Quando a mortalidade corrigida foi calculada pela maior concentração houve uma relação diretamente proporcional a PA (Btak $r^2 = 0,97$; Btk $r^2 = 0,99$; Bta $r^2 = 0,89$), variando de 58,3 a 98,5% de PA7 a PA15, respectivamente (Tabela 3). Os resultados obtidos com *B. salubricola* sugerem que as avaliações realizadas anterior a sete dias podem subestimar a eficiência de Bt. Para larvas de maior capacidade alimentar, como espécies de Noctuidae, Plutellidae e Psychidae avaliações realizadas antes (BLANCO et al., 2009) e após sete dias (ARANDA et al., 1996; LIAO et al., 2002; YEE et al., 2008), mostraram-se eficientes para verificar a mortalidade, entretanto, outros autores em experimentos realizados com *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) (Lepidoptera: Sphingidae) os resultados foram semelhantes ao presente trabalho (Schesser et al., 1977, Schesser & Bulla, 1978).

Desenvolvimento. A maior concentração utilizada nos bioensaios influenciou no desenvolvimento larval ao sétimo dia (Btak $df= 3$, $F= 174,2$, $p < 0,01$; Btk $df= 3$, $F= 49$, $p < 0,01$; Bta $df = 3$, $F= 300$, $p < 0,001$; Testemunha $df = 3$, $F= 54,19$, $p < 0,001$) (Tabela 4). Nos três tratamentos as larvas se encontravam no primeiro instar, sendo o número de indivíduos em Bta e Btak quatro vezes maior que em Btk. Na avaliação realizada ao décimo dia, na maior concentração, houve diferença significativa no número de indivíduos por instar em Bta e Btk (Btk $df= 3$, $F= 25$, $p < 0,01$; Bta $df= 3$, $F= 28,9$, $p < 0,001$; Testemunha $df= 3$, $F= 187,8$, $p < 0,001$) (Tabela 4). Em média de 75% das larvas no tratamento Bta se encontravam no segundo instar, em Btk 100% das larvas encontravam-se no primeiro instar. Em Btak, na maior concentração, ao décimo dia não houve diferença no número de indivíduos registrados em cada instar

(Btak df= 3, F= 3,1, $p < 0,01$) (Tabela 4). Foi observado um número baixo de larvas e estas se encontravam no primeiro e segundo instar. Na menor concentração, ao sétimo dia, as três subespécies de Bt influenciaram no desenvolvimento larval em relação à testemunha (Btak df = 3, F= 36,1, $p < 0,01$; Btk df= 3, F= 16,3, $p < 0,01$; Bta df= 3, F= 1201,8, $p < 0,001$; Testemunha df= 3, F= 187,8, $p < 0,001$) (Tabela 4). Nos tratamentos Bta e Btak 75% das larvas se encontravam no primeiro instar, no tratamento Btk o número de larvas no primeiro e segundo instar não diferenciaram, somando 100% dos indivíduos. Na menor concentração, no décimo dia houve diferença significativa no número de larvas em cada instar (Btak df= 3, F= 36,1, $P < 0,01$; Btk df= 3, F= 7,7, $p < 0,001$; Bta df= 3, F= 4,5, $p = 0,038$) (Tabela 4). Em Bta e Btk não houve diferenciação no número de indivíduos encontrados nos três primeiro instares, contabilizando 100% das larvas nestes estádios. Em Btak 78% das larvas se encontravam no primeiro instar.

Na avaliação realizada aos quinze dias observou fuga de larvas reduzindo o número de larvas por concentração (Tabela 5). Os indivíduos que perfuraram o parafilme estavam nos estádios de quarto a quinto instar e esta situação ocorreu em geral nas concentrações abaixo da CL_{50} . Esse comportamento ocorreu em Btak 11,1%, Btk 8,7% e Bta 7,8% do total de indivíduos tratados. Na literatura há relato de trabalhos com avaliações de mortalidade de até dez dias após tratamento (ER et al., 2007; FRANKENHUYZEN et al., 2008) e não existem referências de fuga de larvas.

A interferência no desenvolvimento das larvas fica evidente através dos estádios em que se encontravam, entretanto, não foi possível confirmar a morte das larvas afetadas por Bt antes de quinze dias. Os resultados indicam diminuição no desenvolvimento larval com a utilização de concentrações sub-letais, isto pode estar relacionado com o comportamento das larvas que após ingestão do Bt apresentam redução ou parada alimentar (CÍCERO et al., 2009), não obtendo a energia necessária para muda. Outros autores mencionam não ocorrer mudança de instar nas larvas devido a inanição provocada após infecção por Bt (ALVES, 1998; MONNERAT et al., 2000; CÍCERO, 2009). Porém, as concentrações utilizadas foram altas e causaram a morte rápida das larvas. Eizaguirre et al. (2005) em bioensaios com *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre, 1827) (Lepidoptera: Noctuidae) encontraram resultados semelhantes ao presente trabalho, mostrando que larvas expostas a concentrações sub-letais reduzem seu desenvolvimento.

Conclusão

Bacillus thuringiensis kurtaki demonstrou ser mais eficaz no controle de *B. salubricola* nas condições de laboratório no presente trabalho. O tempo de alimentação após tratamento influenciou no percentual de mortalidade de larvas e as toxinas de *B. thuringiensis* influenciaram no desenvolvimento larval nas concentrações não letais.

Referências

- Abbott, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.18, p. 265-266, 1925.
- Alves, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Fealq Piracicaba, São Paulo. 1998, 1163p.
- Aranda, E., Sanchez, J., Peferoen, M., Guereca, L., Bravo, A.. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with the Midgut Epithelial Cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Invertebrate Pathology** v. 68. p. 203-212, 1996.
- Blanco, C. A., Gould, F., Vega-Aquino, P., Jurat-Fuentes, J. L., Perera, O. P., Abel C. A. Response of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Incorporated Into Different Insect Artificial Diets. **Journal of Economic Entomology**. n.102 v. 4, p. 1599-1606, 2009.
- Boncheva, R., Dukiandjiev, S., Minkov, I., Maagd, R. A. de., Naimov, S. Activity of *Bacillus thuringiensis* endotoxins against codling moth (*Cydia pomonella* L.) larvae. **Journal Invertebrate Pathology**. v 92, p. 96–99, 2006.
- Bulushova, N. V., Elpidina, E. N., Zhuzhikov, D. P., Lyutikova, L. I. , Ortego, F., Kirillova, N. E., Zalunin, I. A., Chestukhina, G. G. Complex of Digestive Proteinases of *Galleria mellonella* Caterpillars. Composition, Properties, and Limited Proteolysis of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Biochemistry** (Moscow). V. 76, p. 581-589. 2011.

Cícero, E. A. S., Ferraudo, A. S., Lemos, M. V. F. Identificação de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Sphenophorus levis*, o bicudo da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v.68, p.817-823, 2009.

Diaz-Gomez, O., Rodriguez, J. C., Shelton, A. M., Lagunes-t, A., Bujanos-m, R. Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) Populations in Mexico to Commercial Formulations of *Bacillus Thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n.3, p. 963-970, 2000.

Eizaguirre, M., Tort, S., Lopez, C., Albajes, R. Effects of Sublethal Concentrations of *Bacillus thuringiensis* on Larval Development of *Sesamia nonagrioides*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.98, n. 2, p. 464-470, 2005.

Er, M. K., Karadag, S., Mart, C. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on *Thaumatococcus solitaria* Frey. (Lepidoptera: Thaumatococcidae) Larvae in Laboratory Conditions. Turkish **Journal of Agriculture and Forestry**. V. 31, p. 255-261, 2007.

Finney, D. J. **Probit analysis**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1971.

Frankenhuyzen, K. V., Régnière, J., Bernier-Cardou, M. Response of *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* at different ingested doses and temperatures. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 99, p. 263–274, 2008.

Franklin, M. T., Nieman, C. L., Janmaat, A. F., Soberón, M. Bravo, A., Tabashnik, B. E., Gonzalez-Cabrera, J., Molla O., Monton, H., Urbaneja, A. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **BioControl**. v. 56, p. 71-80, 2011.

Joung, K., Cote, J. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Technical Bulletin** n. 29. Horticultural R & D Centre. Saint-Jean-sur-Richelieu. p. 1-16, 2000.

Jyoti, J. L., Brewer, J. G. Median Lethal Concentration and Efficacy of *Bacillus Thuringiensis* Against Banded Sunflower Moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**. V. 92, n.6, p. 1289-1291, 1999.

Liao, C., Heckel, D. G., Akhurst, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera:

Noctuidae), major pests of cotton. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 80, p. 55-63. 2002.

Monnerat, R. J., Bordat, D., Branco, M. C., França, F. H. Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e Inseticidas Químicos Sobre a Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera:Yponomeutidae) e Seus Parasitóides. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 29, n. 4, p. 723-730, 2000.

Monteiro, B. L., Souza, A. Controle de tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em Fraiburgo-SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 2, p. 423-428, 2010.

Parra, J. R. P., Eiras, A. E., Haddad, M. L., Vilela, E. F., Kovalesski, A. Rearing technique of *Phtheochroa cranaodes* Meyrick, 1937 (Lepidoptera: Tortricidae) on artificial diet. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 55, n. 4, p. 537-543, 1995.

Schesser, J. H., Bulla, L. A. Jr. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Spores to the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 35, n. 1, p. 121-123, 1978.

Schesser, J. H., Kramer, K. J., Bulla, L. A. Jr. Bioassay for Homogeneous Parasporal Crystal of *Bacillus thuringiensis* Using the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 33, n.4, p. 878-880, 1977.

Terra, W. R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**. v. 35, p. 181-200, 1990.

Yee, T. S., Ibrahim, Y., Omar, D. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* berliner subspecies *kurstaki* and *aizawai* against the bagworm, *Metisa plana* walker on oil palm. **Journal of Bioscience**, v. 19, n. 1, p. 103-114, 2008.

Zar J.H., 1974. **Biostatistical analysis**. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice-Hall. pp. 620.

Tabelas

Tabela 1. Comparação de médias de mortalidade (%) de *B. salubricola*, entre períodos de avaliação e subespécies de Bt.

Período de Avaliação (dias)	<i>B. thuringiensis</i> <i>aizawai</i> x <i>kurstaki</i>	<i>B. thuringiensis</i> <i>kurstaki</i>	<i>B. thuringiensis</i> <i>aizawai</i>
Sete	29,9 Bc	47,1 Ab	26,6 Bb
Dez	39,6 Bb	54,8 Ab	30,1 Cb
Quinze	50,6 Ba	85,5 Aa	85,8 Aa

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. CL₅₀, slope e comparação de *B. thuringiensis* *aizawai* x *kurstaki*, *B. thuringiensis* *aizawai* em relação a *B. thuringiensis* *kurstaki* em diferentes períodos de avaliação.

Subespécie	Dias de avaliação	CL ₅₀ µg/g (95%)	Slope	X ²	R*
<i>B. thuringiensis</i> <i>kurstaki</i>	Sete	37,7 (29,3-48,7)	1,59±0,191	3,4	
	Dez	24,6 (18,2-32,3)	2,01±0,205	2,31	
	Quinze	1,0 (0,05-3,13)	2,02±0,285	5,48	
<i>B. thuringiensis</i> <i>aizawai</i> x <i>kurstaki</i>	Sete	130,6 (104,5-175,1)	1,22±0,144	0,88	3,5
	Dez	74,9 (63,2-89,2)	1,24±0,121	1,30	3,0
	Quinze	55,6 (45,9-67,2)	0,67±0,121	2,01	55,6
<i>B. thuringiensis</i> <i>aizawai</i>	Sete	213,5 (156,0-332,2)	1,16±0,138	0,92	5,7
	Dez	144,0 (109,5-196,8)	1,42±0,188	1,63	5,9
	Quinze	5,3 (0,25-14,1)	0,64±0,135	5,51	5,3

* Razão entre CL₅₀ Bt *kurstaki* e Bt *aizawai* x *kurstaki* e Bt *aizawai*

Tabela 3. Percentual de mortalidade de larvas de *B. salubricola* expostas a *B. thuringiensis* em períodos diferentes de avaliação.

Subespécies	Dias de avaliação	Concentração (µg/g)*	n	Mortalidade corrigida (%)
<i>B. thuringiensis aizawai x kurstaki</i>	PA7	190,0	72	59,2
	PA10			81,7
	PA15			94,3
<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	PA7	248,5	72	88,7
	PA10			92,8
	PA15			98,5
<i>B. thuringiensis aizawai</i>	PA7	280,0	72	58,3
	PA10			66,2
	PA15			98,5

* Maior concentração utilizada.

n - Número de larvas expostas.

Tabela 4. Percentual de mortalidade de larvas de *B. salubricola* expostas a *B. thuringiensis* em períodos diferentes de avaliação.

	<i>B. thuringiensis aizawai</i>		<i>B. thuringiensis kurstaki</i>		<i>B. thuringiensis aizawai x kurstaki</i>		Testemunha
	Maior Conc.	Menor Conc.	Maior Conc.	Menor Conc.	Maior Conc.	Menor Conc.	
Sete dias							
1º Instar	10,00 A	17,33 A	2,33 a	14,00 a	9,00 a	18,00 a	0,88 b
2º Instar	0,00 B	5,66 B	0,00 b	8,00 a	0,64 b	5,00 b	10,55 a
3º Instar	0,00 B	0,00 C	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	10,00 a
4º Instar	0,00 B	0,00 C	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Dez dias							
1º Instar	1,66 B	6,66 ab	1,66 a	8,33 a	3,11 a	18,00 a	1,33 c
2º Instar	6,00 A	11,66 A	0,00 b	9,33 a	2,66 a	5,00 b	7,55 b
3º Instar	0,00 B	4,33 ab	0,00 b	2,66 ab	0,00 a	0,00 b	13,33 a
4º Instar	0,00 B	0,00 B	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,66 c
Quinze dias							
1º Instar	0,00	0,00 A	0,00	1,00 a	0,00	6,00 a	0,33 c
2º Instar	0,00	3,66 A	0,00	1,33 a	1,00	7,66 a	5,44 b
3º Instar	0,00	3,66 A	0,00	3,33 a	0,00	2,66 a	11,22 a
4º Instar	0,00	0,33 A	0,00	0,00 a	0,00	0,00 a	0,77 c

Tabela 5. Número de indivíduos (n), mortos e percentuais de fuga de larvas por concentração em três subespécies de Bt.

Concentração (µg/g)	n	Mortos	Fuga de larvas (%)
<i>B. thuringiensis aizawai x kurstaki</i>			
PA15			
C1	72	68	0,00
C2	68	52	2,88
C3	68	43	2,88
C4	63	29	6,48
C5	64	23	5,76
C6	65	9	5,04
C7	58	6	10,08
Teste	54	3	12,96
<i>B. thuringiensis kurstaki</i>			
C1	71	70	0,72
C2	72	66	0,00
C3	71	59	0,72
C4	69	56	2,16
C5	64	53	5,76
C6	60	44	8,64
C7	61	39	7,92
Teste	57	3	10,80
<i>B. thuringiensis aizawai</i>			
C1	72	67	0
C2	72	60	0
C3	70	52	1,44
C4	69	47	2,16
C5	64	45	5,76
C6	62	42	7,20
C7	63	38	6,48
Teste	59	4	9,36

n - Número de larvas expostas.

Capítulo II

Eficácia de subespécies de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) e efeito sobre o desenvolvimento larval

Eficácia de subespécies de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) e efeito sobre o desenvolvimento larval*

Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* subspecies and effect on larval development of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae)

JONATHAN PEREIRA¹; LINO BITTENCOURT MONTEIRO².

⁽¹⁾Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia/Ciências Biológicas/Entomologia, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Cx. Postal: 19.020, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: jonathanpereira@yahoo.com.br ⁽²⁾Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitossanidade, Rua dos Funcionários, n.1540, CEP 80035-050, Juvevê, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: lbmonteiro@terra.com.br.

Resumo - *Grapholita molesta* destaca-se como uma das principais pragas da cultura da macieira, o controle deste lepidóptero costuma ser realizado por inseticidas químicos de amplo espectro. O objetivo deste trabalho foi testar a eficácia de *Bacillus thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis kurstaki* e o transcunjugado *B. thuringiensis aizawai* x *kurstaki* no controle de *G. molesta* e verificar o efeito de concentrações subletais sobre o desenvolvimento larval. Os bioassaios foram realizados em laboratório, utilizando microplacas e dieta artificial. Foram utilizadas oito concentrações, a solução contendo *Bacillus* foi aplicada sobre a dieta. Em seguida foi colocada uma larva neonata por poço. As microplacas foram fechadas e mantidas em condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo. As avaliações de mortalidade foram realizadas sete e dez dias após tratamento, simultaneamente foram observados os estádios larvais. Houve diferença significativa na mortalidade entre as datas de avaliação para as três subespécies. *B. thuringiensis kurstaki* e o transcunjugado *aizawai* x *kurstaki* foram mais efetivos no controle de *G. molesta*. As três subespécies de *Bacillus* influenciaram no desenvolvimento das larvas.

Palavras-chave: Mariposa Oriental, Controle Microbiano, Entomopatógeno.

Abstract - *Grapholita molesta* is a major pest of apple trees, the control of Lepidoptera is usually conducted by broad spectrum chemical insecticides but selective for beneficial insects. The objective of this study was to test the

effectiveness of *Bacillus thuringiensis* subspecies *aizawai*, *kurstaki* and hybrid *aizawai* x *kurstaki* in control of *G. molesta* and the effect of sublethal concentrations on the larval development. The bioassays were conducted in the laboratory using microplates and artificial diet. The plates with the larvae were maintained under controlled conditions of temperature, humidity and photoperiod. Eight concentrations were used. An assessment of mortality was conducted seven to ten days after treatment and was simultaneously observed the larval stages until the fifteenth day. There was significant difference in mortality between the dates of assessment for the three subspecies. *B. thuringiensis* and *aizawai* x *kurstaki* hybrid was more effective in control of *G. molesta*. The three subspecies of Bt have influenced the development of larvae.

Keywords: Oriental fruit moth, Microbiology control, Entomopathogen.

INTRODUÇÃO

A presença de resíduo de inseticidas em frutos é elevada quando ocorrem pulverizações na colheita. O intervalo de segurança dos produtos fitossanitários limitam as pulverizações, necessitando de outros agentes de controle que permitam reduzir as perdas por insetos na colheita. Entre as pragas de ocorrência na macieira (*Malus domestica* Borkhausen), destaca-se a mariposa oriental, *Grapholita molesta* (Busk, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae), originária do noroeste da China (Roehrich, 1961).

Os danos deste tortricídeo são ocasionados na fase larval, quando penetram nos frutos e ramos jovens formando galerias (Salles, 1991; Souza *et al.* 2000). O controle é realizado com aplicação de inseticidas químicos (Arioli *et al.* 2004) e produtos a base de entomopatógenos.

No Brasil há registro comercial da bactéria *Bacillus thuringiensis*. A subespécie *kurstaki* pode ser usada no controle de *G. molesta*, enquanto, outras contendo a subespécie *aizawai* e transconjugado *aizawai* x *kurstaki* são autorizadas para controle de lagartas em grãos e cereais. A infecção das larvas pelo entomopatógeno ocorre após a ingestão das pró-toxinas, que agem no mesêntero e levam a morte (Alves, 1998).

O objetivo do presente trabalho foi testar a eficácia de *Bacillus thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis kurstaki* e o transconjugado *B. thuringiensis aizawai* x *kurstaki* no controle de *G. molesta* e verificar o efeito de concentrações subletais sobre o desenvolvimento larval.

MATERIAL E MÉTODOS

***Grapholita molesta*.** A população foi coletada em Vacaria-RS no ano de 2010 em pomares comerciais de maçã na forma de larva, retiradas de frutos. As larvas foram colocadas em caixas plásticas (25cm x 15cm x 15cm) contendo dieta artificial (Arioli *et al.* 2007). As pupas foram colocadas em placas de petri e mantidas em fotofase de 16 horas, UR $60 \pm 10\%$ e temperatura $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Pupas em estágio final foram transferidas para garrafas PET, onde ocorreu a emergência de adultos e oviposição nas paredes das mesmas.

Bioensaios. Os testes foram realizados em microplacas de fundo chato com 96 poços, contendo aproximadamente 150 μL de dieta artificial para lepidópteros (Soybean-Wheat, Stonefly Industries, TX, EUA) em cada poço. A dieta foi compactada no interior do poço para manter a superfície lisa e plana, em seguida foram adicionados 6 μL de calda contendo *B. thuringiensis*. Foram utilizadas as subespécies *kurstaki* linhagem HD1 (Dipel WG, Abbott laboratories, IL, EUA), *aizawai* linhagem ABTS1857 (Xentari WG, Abbott laboratories, IL, EUA) e variedade *aizawai* x *kurstaki* linhagem GC91 (Agree WP, Certis, SC, EUA) em sete concentrações diferentes mais uma referência com água destilada. Para cada tratamento foram feitas três réplicas. Após 20 minutos, com o auxílio de um pincel de ponta fina, cada poço recebeu uma larva neonata com no máximo três horas de eclosão. Os poços da microplaca foram fechados com papel parafinado (Parafilm, Chicago, IL, EUA) para evitar a fuga de larvas e desidratação da dieta. As microplacas foram mantidas em BOD (Eletrolab, mod. 112FC), UR $60 \pm 10\%$, temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 16 horas. Foram considerados mortos os indivíduos que não apresentaram movimento ao toque de um estilete.

Período de avaliação. A mortalidade das larvas foi avaliada sete e dez dias após tratamento. Os dados obtidos foram corrigidos por Abbott (1925), normalizada por arco seno e submetida à análise fatorial (Zar, 1974). As médias de mortalidade ao sétimo e décimo dia de avaliação foram comparadas em cada *Bacillus* através do teste t-student ($p < 0,05$) (Software Assistat Versão Beta 7.6).

***Bacillus thuringiensis*.** Após a definição do melhor período de avaliação, a mortalidade foi comparada entre *Bacillus*. As médias foram testadas por Tukey ($p < 0,05$). A CL_{50} foi calculada por Probit através do software PoloPlus 1.0 (LeOra Software, 2003).

Desenvolvimento larval. Simultaneamente aos períodos de avaliação foi identificado os instares larvais em cada concentração, nos três tratamentos com *B. thuringiensis*, através da troca da cápsula cefálica (Dyar, 1890). Para verificar em qual instar as larvas se encontravam, foi realizado análise de variância, considerando as cinco menores concentrações. As médias foram comparadas por Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Período de Avaliação. A mortalidade de larvas de *G. molesta* ao décimo dia foi maior em relação ao sétimo dia (Btak: $F = 593,5344$, $df = 1$, $p < 0,001$; Btk: $F = 759,4302$, $df = 1$, $p < 0,001$; Bta: $F = 306,2469$, $df = 1$, $p < 0,001$) (Tabela 1). A diferença de três dias entre as avaliações foi suficiente para aumentar a mortalidade média em 55% para Btk e Bta, enquanto que para Btak 45%. Estes percentuais de mortalidade média foram calculados a partir dos dados de mortalidade corrigida, transformados por arco seno, considerando todas as concentrações utilizadas no bioensaio, isto pode responder as mortalidades abaixo de 65%.

A baixa mortalidade nas menores concentrações, pode estar relacionada com o comportamento alimentar. O inseticida foi depositado sobre a dieta e a quantidade de alimento consumido pelas larvas é baixo devida sua massa corporal pequena (Panizzi & Parra, 2009).

Quando se considerou a maior concentração utilizada nos bioensaios, na avaliação de dez dias os três tratamentos obtiveram percentuais de mortalidade acima de 85% (Tabela 2). O acréscimo na mortalidade, decorrente dos três dias de diferença na avaliação foram para Btak, Btk e Bta de 25%, 74% e 66%, respectivamente. As maiores mortalidades observadas aos décimo dia sugerem que as avaliações sejam realizadas neste período. Schesser *et al.* (1977), trabalhando com *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) (Lepidoptera: Sphingidae), verificaram que a mortalidade aumentou com o período de avaliação.

***Bacillus thuringiensis*.** Reorganizando os dados de mortalidade para comparar o efeito dos três *B. thuringiensis* no controle de *G. molesta* verificou-se que aos décimo dias houve diferença significativa ($F = 10,21$, $df = 2$, $p < 0,001$) (Tabela 1). Btk e Btak foram semelhantes estatisticamente, com mortalidade em média acima de 10% em relação a Bta. A semelhança estatística entre Btk e Btak pode ser explicada pela presença do Cry1Ac em ambos *Bacillus* (Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1996). O Btak possui em sua composição os Cry1Da e Cry1Ca, existentes em Bta (Liu *et al.*, 2004; Moar *et al.*, 1990), porém, não encontrados em Btk o que poderia torná-lo mais eficiente. A população deste estudo não recebeu nenhuma pulverização a base de Bt no campo, o que pode ser uma condicionante aos resultados encontrados, pois Diaz-Gomes *et al.* (2000) e, observaram que diferentes populações de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) responderam de maneira desigual aos produtos a base de Bt.

Observando as CL_{50} (Tabela 3) Bta e Btak apresentaram em média uma CL_{50} 1,5 vezes maior que Btk e para CL_{95} este valor reduziu ficando próximo de um. A CL_{95} encontrada em Btk, produto com registro para *G. molesta*, foi aproximadamente cinco vezes menor que a dose de campo recomendada de 1000ppm. Comparações de eficácia de inseticidas são relativas, pois as populações sofrem pressões seletivas distintas a campo e laboratório. Btk e Bta comparados a produtos químicos já demonstraram eficácia de controle a campo, quando a mortalidade foi avaliada a mais de 15 dias (Monteiro & Souza, 2010; Siqueira & Grützmacher, 2005).

Desenvolvimento larval. Os inseticidas Bta ($df=3$; $F=549,6$; $p<0,001$), Btk ($df=3$; $F=507,0$; $p<0,001$) e Btak ($df=3$; $F=476,3$; $p<0,001$) retardaram o desenvolvimento larval na avaliação realizada ao sétimo dia em relação a testemunha ($df=3$; $F=22,12$; $p=0,0017$) (Tabela 4). Dentre os *Bacillus*, Bta manteve o maior número de larvas no primeiro instar ao sétimo dia, enquanto em Btk ocorreu um grande número de larvas

no terceiro instar (Figuras 1C, 1A). Nos três tratamentos o desenvolvimento larval foi distinto da testemunha, onde não foi aplicado *Bacillus*, 50% das larvas se encontravam no 2 instar. Na avaliação realizada ao décimo dia, Bta ($df=3$; $F=45,5$; $p<0,001$), Btk ($df=3$; $F=234,5$; $p<0,001$) e Btak ($df=3$; $F=552,0$; $p<0,001$) retardaram o desenvolvimento larval de *G. molesta* em relação a testemunha ($df=3$; $F=277,5$; $p<0,001$)(Tabela 4). Nos tratamentos, Btk e Btak observou-se a presença de cerca de 7% das larvas no quarto instar, entretanto, Btak apresentou menos de 1% de larvas no primeiro instar, enquanto Btk 37%. Em Bta cerca de 50% das larvas se encontravam no terceiro instar, sem ocorrência de indivíduos no quarto instar.

Nos três tratamentos com Bt as larvas reduziram o crescimento e se mantiveram por mais tempo nos primeiros instares em relação a testemunha. Foi observado menor consumo de dieta contaminada em relação a testemunha, indicando efeito deterrente do Bt, como visto por outros autores (Viciomini *et al.* 2006; Polanczyk *et al.* 2000; 2003). Os indivíduos sobreviventes a restrição alimentar na fase larval provavelmente quando adultos terão menor tamanho, tempo de vida e redução da fertilidade nas fêmeas (Dmitriew & Rowe, 2011; Meissle *et al.* 2010; Ross *et al.* 2011). O efeito de redução no desenvolvimento larval também foi observado em parasitóides que se alimentaram de larvas sobreviventes a exposição a Bt (Mohan *et al.* 2008).

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa e a Universidade Federal do Paraná por possibilitar execução da pesquisa.

REFERENCIAS

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology** 18: 265-266.

Alves, S.B. 1998. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1163p.

Arioli, C. J., Botton, M., Carvalho, G. A. 2004. Chemical control of *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) in peach orchards. **Ciência Rural** **34**:1695-1700.

Arioli, J. C., Molinari, F., Botton, M., Garcia, S. M. 2007. Técnica de criação de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório utilizando dieta artificial para a produção de insetos visando estudos de comportamento e controle. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPFT. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** **13**: 14.

Diaz-Gomez, O., Rodriguez, J. C., Shelton, A. M., Lagunes-t, A., Bujanos-m, R. 2000. Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) Populations in Mexico to Commercial Formulations of *Bacillus Thuringiensis*. **Journal Economic Entomology** **93**: 963-970.

Dmitriew, C. & L. Rowe. 2011. The Effects of Larval Nutrition on Reproductive Performance in a Food-Limited Adult Environment. **PLoS ONE** **6**: 1-6.

Dyar, H. G. The number of molts of lepidopterous larvae. 1890. **Psyche** **5**: 420-422.

Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., PusztaiCarey, M. 1996. Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology** **89**: 798-804.

Liu, K. Y., Zheng, B. L., Hong, H. Z., Jiang, C. F., Peng, R., Peng, J. X., Yu, Z. H., Zheng, J., Yang, H. 2004. Characterization of cultured insect cells selected by *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal** **40**: 312-317.

Meissle, M., Hellmich, R. L., Romeis, J. 2011. Impact of Cry3Bb1-expressing Bt maize on adults of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pest Management Science** **67**: 807-814.

Moar, W. J., Masson, L., Brousseau, R., Trumble, J. T. 1990. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. **Applied and Environmental Microbiology** **56**: 2480-2483.

Mohan, M., Sushil, S.N., Bhatt, J. C., Gujar, G. T., Gupta, H. S. 2008. Synergistic interaction between sublethal doses of *Bacillus thuringiensis* and *Campoletis chloridae* in managing *Helicoverpa armigera*. **BioControl** **53**:375-386.

Monteiro, L. B. & A. Souza. 2010. Controle de tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em Fraiburgo-SC. **Revista Brasileira de Fruticultura** **32**: 423-428.

Panizzi, A. R. & J. R. P. Parra. 2009. **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, p. 1164.

Polanczyk, R. A., Garcia, M. O., Alves, S. B. 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista Saúde Pública** **37**: 813-813.

Polanczyk, R., Silva, P. F. R., Fiuza, M. L. 2000. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian journal of Microbiology** **31**: 165-167.

Roehrich, R., 1961. Contribution a l'étude écologique des populations de la tordeuse de pêcher (*Grapholita molesta* Busck) dans la région Aquitaine. **Annales des Epiphyties** **14**: 114.

Ross, L., Dealey, E. J., Beukeboom, L. W., Shuker, D. M. 2010. Temperature, age of mating and starvation determine the role of maternal effects on sex allocation in the mealybug *Planococcus citri*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** **65**: 909-919.

Salles, L. A. B. 1991. *Grafolita* (*Grapholita molesta*): bioecologia e controle. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT. **Documentos** **42**:13.

Siqueira, P. R. E. & A. D. Grutzmacher. 2005. Avaliação de inseticidas para o controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de pessegueiro sob produção integrada na região da Campanha do RS. **Revista Brasil Agrociência** **11**: 185-191.

Souza, B., Santa-Cecília, C. V. L., Sousa, V. O. L. 2000. Ocorrência e Danos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em Pessegueiros no Município de Caldas, MG. **Anais Sociedade Entomológica** **29**: 185-188.

Schesser, J. H., Kramer, K. J., Bulla, L. A. Jr. 1977. Bioassay for Homogeneous Parasporal Crystal of *Bacillus thuringiensis* Using the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*. **Applied and Environmental Microbiology** 33: 878-880.

Vicidomini S., Laudonia S., Bernardo U., Sannino L. 2006. Effetti letali e subletali di *Bacillus thuringiensis* Berliner ssp. *aizawai* su larve di *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) in prove di laboratorio esteso. **Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri** 61: 53-61.

Zar J.H., 1974. **Biostatistical analysis**. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice-Hall. p. 620.

TABELAS

Tabela 1. Comparação de médias de mortalidade (%) entre períodos de avaliação e subspécies de Bt.

Avaliações (Dias)	<i>B. thuringiensis</i> <i>aizawai</i> x <i>kurstaki</i>	<i>B. thuringiensis</i> <i>kurstaki</i>	<i>B. thuringiensis</i> <i>aizawai</i>
Sete	35,2 B	21,7 B	25 B
Dez	63,4 Aa	63,0 Aa	57 Ab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste t- student e teste Tukey e a 5% de probabilidade, respectivamente.

Tabela 2. Percentual de mortalidade de três *B. thuringiensis* em diferentes datas de avaliação.

Tratamentos	Avaliações (Dias)	Concentração (µg/g)*	N	Mortalidade corrigida (%)
<i>B. thuringiensis</i> <i>aizawai</i> x <i>kurstaki</i>	Sete	130,0	72	73,9
	Dez	130,0	72	92,8
<i>B. thuringiensis</i> <i>kurstaki</i>	Sete	100,0	72	50,0
	Dez	100,0	72	87,1
<i>B. thuringiensis</i> <i>aizawai</i>	Sete	100,0	72	54,2
	Dez	100,0	72	90,3

*Maior concentração utilizada.
n - Número de larvas expostas.

Tabela 3. Comparação de eficácia de *Bacillus thuringiensis* e razão entre CL₅₀ e CL₉₅.

Formulação	CL ₅₀ µg/g (95%)	CL ₉₅ µg/g (95%)	Slope	χ ²	R*	R**
<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	14,9 (10,3 - 20,0)	185,3 (107,2 - 490,2)	1,5±0,162	6,0		
<i>B. thuringiensis azawai x kurstaki</i>	21,7 (16,7- 26,9)	149,7 (104,0 - 261,3)	1,9±0,182	5,0	1,5	0,8
<i>B. thuringiensis azawai</i>	20,7 (17,5 - 24,5)	202,4 (139,3 - 344,7)	1,6±0,159	2,0	1,4	1,1

* Razão entre CL₅₀ de Btk e relação à Btak e Bta.** Razão entre CL₉₅ de Btk e relação à Btak e Bta.Tabela 4. Estádios larvais de *G. molesta* expostas a *B. thuringiensis*.

<i>B. thuringiensis kurstaki</i> (Dipel)				
Estádios	Sete dias		Dez dias	
	Concentrações	Testemunha	Concentrações	Testemunha
1º Instar	6,53 b	6,55 b	4,20 b	1,22 c
2º Instar	3,73 c	11,77 a	5,07 a	7,77 b
3º Instar	10,20 a	5,11 b	1,80 c	12,44 a
4º Instar	0,00 d	0,00 c	0,20 d	2,00 c
<i>B. thuringiensis aizawai x kurstaki</i> (Aagree)				
1º Instar	7,20 b	6,55 b	0,07 d	1,22 c
2º Instar	8,00 a	11,77 a	6,27 a	7,77 b
3º Instar	2,67 c	5,11 b	4,87 b	12,44 a
4º Instar	0,40 d	0,00 c	0,80 c	2,00 c
<i>B. Thuringiensis aizawai</i> (Xentari)				
1º Instar	12,20 a	6,55 b	5,07 a	1,22 c
2º Instar	6,47 b	11,77 a	5,20 a	7,77 b
3º Instar	1,53 c	5,11 b	2,40 b	12,44 a
4º Instar	0,00 d	0,00 c	1,13 b	2,00 c

FIGURAS

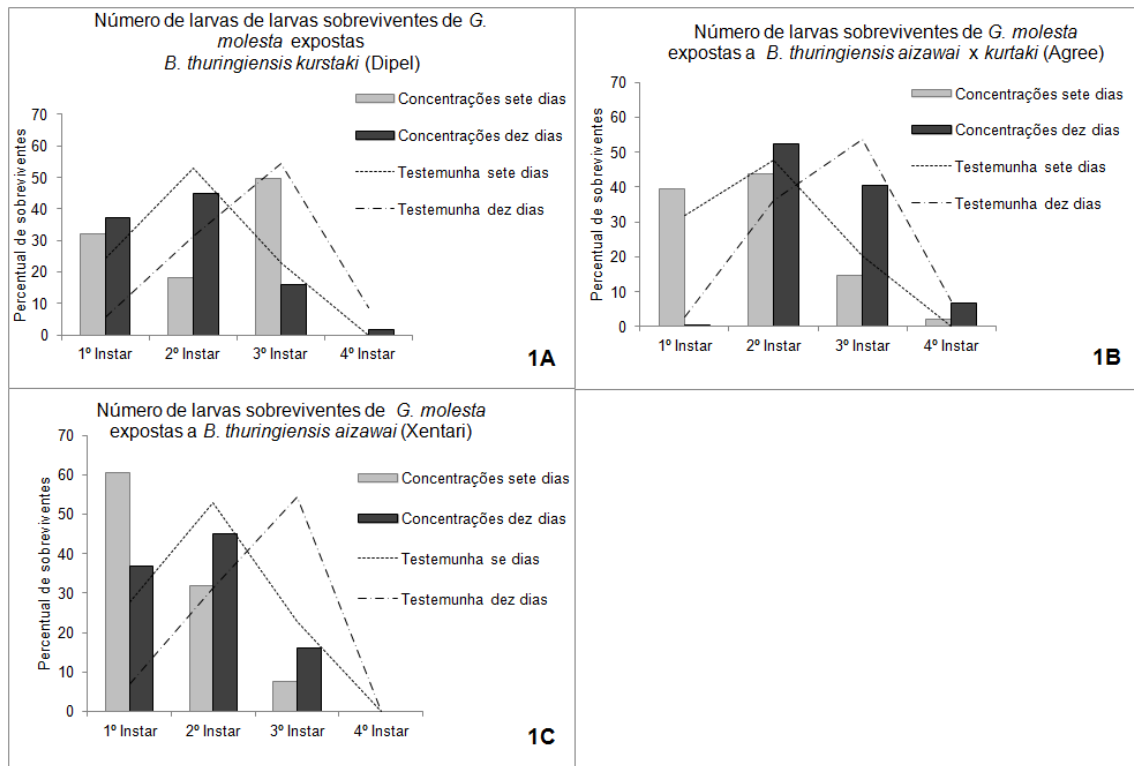


Figura 1. Número de larvas sobreviventes de *G. molesta* expostas a *B. thuringiensis* em dois períodos de avaliação.

Capítulo III

**Biótipos de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae)
caracterizados por infravermelho próximo e suscetibilidade a *Bacillus
thuringiensis kurstaki***

**Biótipos de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae)
caracterizados por infravermelho próximo e suscetibilidade a *Bacillus
thuringiensis kurstaki***

Jonathan Pereira⁽¹⁾, Lino Bittencourt Monteiro⁽²⁾.

⁽¹⁾Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia/Ciências Biológicas/Entomologia, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Cx. Postal: 19.020, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: jonathanpereira@yahoo.com.br ⁽²⁾Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitossanidade, Rua dos Funcionários, n.1540, CEP 80035-050, Juvevê, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: lbmonteiro@terra.com.br.

Resumo – A mariposa oriental, *Grapholita molesta* é uma das principais pragas de macieira, suas larvas penetram nos frutos e ramos jovens da planta formando galerias. O uso intensivo de inseticidas químicos no manejo deste inseto pode selecionar populações resistentes. Uma alternativa biológica é a aplicação da bactéria *Bacillus thuringiensis* no controle. O objetivo do presente trabalho foi verificar a suscetibilidade de *G. molesta* a *B. thuringiensis kurstaki* e diferenciar populações através de infravermelho próximo (NIRS). Foram utilizadas quatro populações de *G. molesta* de origem brasileira e uma européia. Os bioensaios foram realizados em microplacas com dieta artificial, em cada poço foi aplicado 6µL de concentração de *B. thuringiensis kurstaki* e em seguida uma larva neonata. A mortalidade foi verificada ao sétimo e décimo dias após tratamento. Foram calculadas as CL₅₀ e 95 através de análise de Probit e as mortalidades verificadas nas populações foram comparadas por análise fatorial. Quinze pupas de dois a cinco dias de idade de cada população foram submetidas a leituras de infravermelho próximo, os espectros foram analisados através de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Os bioensaios mostraram que as populações de Vacaria-RS e Fraiburgo-SC se diferenciaram das demais, apresentando CL₅₀ três vezes maior que a população referência. A análise dos espectros das pupas possibilitou a diferenciação das cinco populações.

Palavras-chave: Mariposa oriental, NIRS, *Bacillus thuringiensis*.

Biotypes characterization of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) using Near Infrared and Bioassays with *Bacillus thuringiensis kurstaki*

Abstract - *G. molesta* is a key pest of apple tree. The larvae penetrate fruits and young branches of the plant damage. The intensive use of chemical pesticides can select resistant insects. *Bacillus thuringiensis* is a biological control alternative. The objective this study was to determine the susceptibility of *G. molesta* to *B. thuringiensis kurstaki* and distinguish populations by NIRS. We used four populations of *G. molesta* from Brazil and one Europe. Bioassays were conducted in microplates with artificial diet in each well was used 6µL concentration of *B. thuringiensis kurstaki*

and then put a neonate. Mortality was verified seven and ten days after treatment. We calculated the LC_{50} and $_{95}$, using probit analysis and the corrected mortality of populations was compared by factor analysis. Thirty pupae of two to five days old from each population were submitted to readings of near-infrared spectra were analyzed with partial least squares regression (PLS). The LC_{50} and $_{95}$ of the population of Vacaria-RS was two to three times higher than the susceptible population and was statistically different from all others.

Keywords: Oriental fruit moth, NIRS, *Bacillus thuringiensis*.

INTRODUÇÃO

Grapholita molesta é uma praga cosmopolita, sua ocorrência na América do Sul data de 1929 em pomares de pêssago (Gonzales, 1986). No Brasil há registros deste tortricídeo em pomares de macieira nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Reis *et al* 1988) nos cultivares com maior exigência de frio, como, Fuji e Gala. Nos anos 90, houve dispersão da praga para os estados de Paraná e São Paulo, áreas de menor intensidade de frio e adequadas para a variedade de maçã Eva (Hauagge & Tsuneta 1999, Roberto *et al* 2006). A ampla distribuição geográfica e facilidade adaptativa de uma praga podem contribuir para o aumento da variabilidade genética (Capy *et al* 1993, Weng *et al* 2010). Segundo Souza (2011), fatores climáticos, físicos, químicos e ausência de competição interespecífica podem selecionar biótipos.

A identificação de biótipos de insetos não utiliza um protocolo padrão. Estes podem ser reconhecidos por parâmetros biológicos, como, tolerância a diferentes temperaturas (Dres & Mallet, 2002), caracterização molecular (Berry *et al* 2004), diferença na aceitação da planta hospedeira (Burd & Potter, 2006), entre outros. Estudos de suscetibilidade em *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) a inseticidas neonicotinoides proporcionaram a identificação de Biótipos B e Q (Horowitz *et al* 2005). A relação entre biótipos e inseticidas químicos é mostrada em vários estudos (Ma *et al* 2007, Sotelo *et al* 2009, Twari *et al* 2011), entretanto, a poucos trabalhos visando identificar populações selecionadas por entomopatogenos.

Bacillus thuringiensis (Bt) é utilizado no período de colheita de maçã em função da ausência de intervalo de segurança (Monteiro & Souza, 2010), porem,

frequentes pulverizações com Bt podem selecionar populações tolerantes (Imai *et al* 1999). Bioensaios para identificação de populações suscetíveis a produtos fotossanitários são complementados por análises genéticas ou bioquímicas (Ceruti & Lázzari 2003, Kanga *et al* 2002). Atualmente, a técnica de infravermelho próximo (NIRS), está sendo adaptada para área de entomologia, apresentando a vantagem de não ser destrutiva e utilizar amostras vivas ou mortas (Pasquini, 2003).

O NIRS foi utilizado para identificação de fragmentos de insetos em farinha e espécies crípticas de pragas de grãos armazenados (Perez-Mendoza *et al* 2002, Dowell *et al* 1999) e adaptado para identificação de biótipos de duas populações de *G. molesta*, geograficamente distintas (Teixeira *et al* dados não publicados).

O objetivo deste trabalho foi diferenciar quatro biótipos de *G. molesta* de regiões produtoras de maçã do Sul do Brasil, por meio de bioensaios com *B. thuringiensis kurstaki* e infravermelho próximo.

MATERIAL E MÉTODOS

***Grapholita molesta*.** As populações foram coletadas em pomares comerciais de maçã localizados em Vacaria (Rio Grande do Sul, 2011), Fraiburgo (Santa Catarina, 2010), Porto Amazonas (Paraná, 2008), Lages (Santa Catarina, 2008). As características dos pomares de coleta são:

Vacaria (28°30'44"S, 50°56'2"O, altit. 971 m, Cfb-Koppen) e *Fraiburgo* (27°01'34"S, 50°55'17"O, altit. 1048 m, Cfb). Regiões pioneiras no plantio de macieira no sul do Brasil, com plantio das variedades Gala e Fuji. A estratégia fitossanitária foi convencional, nos últimos 20 anos, com utilização de inseticidas fosforados e piretróides, em torno de 15 pulverizações por safra. As pragas chaves são *G. molesta* e *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) e *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae).

Lages (27°48'58"S, 50°19'34"O, altit. 930m, Cfb). Situada aproximadamente 100 km ao sul de Fraiburgo, apresenta pomares novos de Gala e Fuji, isolados. As mesmas pragas encontradas em Vacaria e Fraiburgo ocorrem na região, entretanto, em menores densidades populacionais.

Porto Amazonas (25°32'8"S, 49°53'33"O, altit. 854m, Cfb). O cultivo da maçã na região foi ampliado no final dos anos 90 e está localizada a 300 km ao norte de Fraiburgo. O clima ameno proporciona precocidade na colheita das variedades Gala e Eva em relação a demais regiões. A praga de maior importância é *G. molesta*, pois *A. fraterculus* e *B. salubricola* ocorrem com menor frequência. O número de tratamentos com inseticidas fosforados fica em torno de seis pulverizações por safra. *População Referencia* (44°36'39"N, 10°5'27"L, altit. 107m, Cfb) Foi coleta em pessegueiro na região de Emilia Romana, Itália, em 1995 e multiplicada em laboratório desde então.

Criação de *G. molesta*. As larvas foram coletadas em maçãs e colocadas em caixas plásticas (25cm x 15cm x 15cm) contendo dieta artificial (Arioli *et al* 2007). As pupas foram transferidas e mantidas em garrafas PET, onde ocorreu emergência dos adultos e oviposição. Todas as etapas da criação ocorreram a 16 horas de fotofase, UR 60 ± 10% e temperatura 21 ± 2°C.

Bioensaios. Os testes com *Bacillus thuringiensis* foram conduzidos em microplacas de 96 poços, recebendo 150µl de dieta artificial por poço (Soybean-Wheat, Stonefly Industries, TX, EUA). Foram testadas sete concentrações de *B. thuringiensis kurstaki* linhagem HD1 (Dipel WG, Abbott Laboratories, IL, EUA), colocando seis microlitros sobre a dieta por poço. A testemunha foi aplicada água destilada. Cada poço recebeu uma larva neonata com até três horas da eclosão, cerca de 20 minutos após a adição do Bt. Foram testadas três replicas com 24 indivíduos de cada concentração. Os poços foram fechados com papel parafinado (Parafilm, IL, EUA) para evitar a fuga das larvas e desidratação da dieta. A mortalidade foi registrada no décimo dia após tratamentos. Considerou-se morta as larvas que não reagiram ao toque de um estilete. As microplacas foram mantidas em BOD (Eletrolab, mod. 112FC), UR 60 ± 10%, temperatura de 21 ± 2°C, fotofase de 16 horas.

Infravermelho próximo (NIRS). Os espectros de NIRS foram obtidos por um espectrofotômetro Tensor 32 (Bruker do Brasil, SP, BR) equipado com uma fonte de luz de brometo de potássio e um detector de sulfato de glicerina (DTGS), operando na região de 800 até 2500 nm. A faixa espectral foi de 7500 para 4000 cm⁻¹ (1428-2500 nm) com a resolução de 1 cm⁻¹. Quinze pupas machos com até três dias de idade de cada população foram sexadas e submetidas ao leitor de infravermelho. Foram feitas 32 varreduras para cada indivíduo.

Análise Bioensaios. A mortalidade foi corrigida por Abbott (1925) e os dados foram submetidos à análise Probit para determinar a CL_{50} e CL_{95} (PoloPlus 1.0, Software LeOra, 2003). As mortalidades corrigidas foram normalizadas utilizando a função arco seno e submetida à análise fatorial (Zar, 1974), as médias foram comparadas por Scott-Knott 5% (Software Assistat Versão Beta 7.6).

Análise NIRS. Os espectros foram transformados usando a primeira derivada de Savistky-Golay (janela de 21 pontos e polinômio de segunda ordem), posteriormente foi avaliada a capacidade de diferenciar as populações de *G. molesta* através de pupas do sexo masculino por análise de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Os modelos de calibração multivariada foram desenvolvidos com uso do programa (UnscramblerTM versão 9.1, Camo software AS, Oslo, Norway).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biensaios. A mortalidade corrigida foi significativa entre as populações de *G. molesta* exposta a Btk ($df= 4$; $F= 5,33$; $p < 0,001$) (Tabela 1). As populações de Vacaria e Fraiburgo diferenciaram em relação a população referência e às demais, apresentando um percentual de mortalidade menor. Observando a CL_{50} , foi possível identificar semelhança ao resultado de mortalidade, sendo visível dois grupos de *G. molesta* dentre as populações.

Os pomares localizados em Vacaria e Fraiburgo foram expostos ao longo dos anos a um grande número de aplicações de produtos fitossanitários para o controle de moscas e trotricideos. Em função da ausência de intervalo de segurança, Btk foi frequentemente utilizado na colheita, portanto, estes resultados podem estar relacionados com o histórico fitossanitário. Estudos mostraram que houve seleção de lepidópteros expostos a toxinas de Btk linhagem HD-1 (Alinia *et al* 2000, Higginson *et al* 2005, Bird & Akhurst 2007, Cacia *et al* 2010), Isto poderia ser um fator na seleção de novos biótipos.

No presente trabalho foi possível verificar suscetibilidade entre as populações, entretanto, para afirmar a existência de seleção de indivíduos é necessário análises mais apurada, como, genética e enzimática. Diaz-Gomez *et al* (2000), trabalhando

com *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) encontraram diferenças entre populações expostas a Btk. Hama *et al* (1992) verificou a seleção de indivíduos resistentes de *P. xylostella*, quando expostas a pulverizações sucessivas de Btk a campo. Após resistente, esta condição permaneceu estável por 17 gerações em laboratório (Imai *et al.*, 1999). Isto pode ser um indicativo de que no campo a pressão de seleção exercida pelo sistema de produção e ambiente pode selecionar indivíduos, entretanto, não os caracteriza como biótipos pela relativa facilidade de retorno a condição inicial.

NIRS. As cinco populações de *G. molesta* diferenciaram-se através de infravermelho próximo (Tabela 2). A análise de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) gerou dois fatores ou componentes principais (PCs), cada um responsável por um percentual da resposta, permitindo agrupar as populações (Figura 1). No primeiro componente principal calculado pelo PLS os eixos x, y e z foram responsáveis por 20%, 11% e 7% do resultado, respectivamente. No segundo componente os valores para x, y e z foram 49%, 40% e %, respectivamente.

As diferenças observadas através do NIR podem estar relacionadas a fatores ambientais do local de origem dos insetos, pois as pupas estavam nas mesmas condições de laboratório. A diferenciação em mais de dois grupos de *G. molesta* através do NIRS, em contraste ao resultado dos bioensaios, pode ser explicada pela maior sensibilidade da análise. Emura *et al* (2006), caracterizaram diferentes linhagens de milho transgênico através de análises genéticas e utilizaram NIR para complementar, encontrando os mesmos resultados. A diferenciação linhagens de organismo através de NIR foi obtida por Scullion *et al* (2002), que estudaram cepas de bactérias em solos. Teixeira *et al.* (dados não publicados), caracterizaram duas populações de *G. molesta* por meio de ovos, larvas, pupas e adultos, entretanto, a origem geográfica dos insetos foi continental, facilitando a separação dos biótipos.

A técnica de infravermelho permitiu distinguir as cinco populações, porém, os bioensaios identificaram dois grupos entre as mesmas. A caracterização de uma população como biótipo exige estudos mais avançados, entretanto, a distinção de grupos entre populações abre possibilidade para outros estudos que permitam identificar biótipos.

REFERENCIAS

Abbott, WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol 18: 265-266.

Alinia F, Cohen MB, Gould F (2000) Heritability of tolerance to the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). J Econ Entomol 93: 14-17.

Arioli JC, Molinari F, Botton M, Garcia SM (2007) Técnica de criação de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório utilizando dieta artificial para a produção de insetos visando estudos de comportamento e controle. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPFT. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 13: 14.

Berry SD, Fondong VN, Rey C, Rogan D, Fauquet CM, Brawn JK (2004) Molecular evidence for five distinct *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) geographic haplotypes associated with cassava plants in sub-saharan Africa. Ann Entomol Soc Am 97: 852-869.

Bird LJ, Akhurst RJ (2007) Effects of host plant species on fitness costs of Bt resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Biol Control 40: 196-203.

Burd JD, Potter DR (2006) Biotypic diversity in greenbug (Hemiptera: Aphididae): haracterizing new virulance and host associations. J Econ Entomol 99: 959-965.

Caccia S, Hernández-Rodríguez CS, Mahon RJ, Downes S, James W, Bautsoens N, Rie JV, Ferré J (2010) Binding Site Alteration Is Responsible for Field-Isolated Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A Insecticidal Proteins in Two *Helicoverpa* Species. PLoS ONE 5: 4.

Capy P, Pla E, David JR (1993) Phenotypic and genetic variability of morphometrical traits in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*.I. geographics varitions. Genet Sel Evol 25: 517-536.

Ceruti FC, Lázari SMN (2003) Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas Rev Bras Entomol 47:447-453.

Diaz-Gomez O, Rodriguez JC, Shelton AM, Lagunes-t A, Bujanos-m R (2000) Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) Populations in Mexico to Commercial Formulations of *Bacillus Thuringiensis*. J Econ Entomol 93: 963-970.

Dowell FE, Throne JE, Wang D, Baker JE (1999) Identifying stored-grain insects using near-infrared spectroscopy. J Econ Entomol 92: 165-169.

Dres M, Mallet J (2002) Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. Phil Trans R Soc Lond 357: 471-492.

Emura K, Yamanaka S, Isoda H, Watanabe KN (2006) Estimation for different genotypes of plants based on DNA analysis using Near-infrared (NIR) and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Breed Sci 56: 399-403.

Gonzales RH (1986) Phenology of the oriental peach moth. Aconex 12: 5-12.

Hama H, Suzuki K, Tanaka H (1992) Inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* formulations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Yponomeutidae). Appl Entomol Zool 27: 355-362.

Hauagge R, Tsuneta M (1999) "IAPAR 75 – Eva", "IAPAR 76 - Anabela" e "IAPAR 77 – Carícia" – Novas cultivares de macieira com baixa necessidade em frio. Ver Brás Frut 21: 239-242.

Higginson DM, Morin S, Nyboer, ME, Biggs, RW, Tabashnik, BE, Carrière, Y (2005) Evolutionary tradeoffs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crops: fitness cost affecting paternity. Evolution 59: 915-20.

Horowitz AR, Kontsedalov S, Khasdan V, Ishaaya I (2005) Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and Pyriproxyfen resistance. Arch Insect Biochem Physiol 58: 216-225.

Imai K, Mori Y (1999) Levels, inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* formulation in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae) from Thailand. Appl Entomol Zool 34: 23-29.

Kanga LHD, Adamczyk J, Marshall K, Cox R (2010) Monitoring for resistance to Organophosphorus and Pyrethroid insecticides in varroa mite populations. J Econ Entomol 103: 1797-1803.

Ma D, Gorman K, Devine G, Luo W, Denholm I (2007) The biotypes and insecticide-resistance status of whiteflies, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), invading cropping systems in Xinjiang Uygur Autonomous Region, northwestern China. *Crop Prot* 26: 612-617.

Monteiro LB, Souza A (2010) Controle de tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em Fraiburgo-SC. *Rev Bras Frutic* 32 : 2010.

Pasquini C (2003) Near infrared spectroscopy: fundamentals practical aspects and analytical applications. *J Braz Chem Soc* 14: 138-219.

Perez-mendoza J, Throne JE, Maghirang EB, Dowell FE, Baker JE (2005) Insect fragments in flour: relationship to lesser grain borer. *J Econ Entomol* 98: 2282-2291.

Reis FW, Nora I, Melzer R (1988) Population dynamics of *Grapholita molesta*, Busk, 1916, and its adaptation on apple in south Brazil. *Acta Horticult* 232: 204-208.

Roberto SR, Kagueyama MH, Santos CE (2006) Indução da brotação da macieira 'Eva' em região de baixa incidência de frio. *Rev Bras Frutic* 28 : 128-130.

Scullion J, Elliott GN, Huang WE, Goodacre R, Worgan H, Darby R, Bailey MJ, Gwynn-Jones D, Griffith GW, Winson MK, Williams PA, Clegg C, Draper J (2003) Use of earthworm casts to validate FT-IR spectroscopy as a 'sentinel' technology for high-throughput monitoring of global changes in microbial ecology. *Pedobiologia* 47: 1-7.

Sotelo P, Starkey, S, Voothuluru, P, Wilde GE, Smith CM (2009) Resistance to Russian wheat Aphid biotype 2 in CIMMYT synthetic hexaploid wheat lines. *J Econ Entomol* 102: 1255-1261.

Souza NR (2010) Processos genético-evolutivos e os recursos fitogenéticos. *Inst Nac Pes Amaz* 1: 1-12.

Tiwiri S, Mann RS, Rogers ME, Stelinski LL (2011) Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest Manag Sci* 67: 1258-1268.

Weng Y, Perumal A, Burd JD, Rudd JC (2010) Biotypic Diversity in Greenbug (Hemiptera: Aphididae): Microsatellite-Based Regional Divergence and Host-Adapted Differentiation. *J Econ Entomol* 103: 1454-1463.

Zar JH (1974) Biostatistical analysis. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice-Hall. p. 620.

TABELAS

Tabela 1. Comparação de médias de mortalidade corrigida, CL₅₀ e CL₉₅.

Tratamentos	Mortalidade corrigida (%)*	CL ₅₀ µg/g (95%)	CL ₉₅ µg/g (95%)	Slope	χ^2	R**
Emilia Romana-ITA	88,8 a	4,6 (2,7-6,4)	44,9 (33,7-69,7)	1,67±0,23	2,82	
Porto Amazonas-PR	84,9 a	6,1 (4,2-7,8)	51,0 (38,4-77,8)	1,78±0,21	1,61	1,3
Lages-SC	84,1 a	6,2 (4,2-7,9)	57,3 (42,4-89,9)	1,69±0,21	3,3	1,3
Fraiburgo-SC	68,3 b	13,4 (11,1-15,8)	84,0 (64,4-120,9)	2,06±0,19	2,1	2,9
Vacaria-RS	66,7 b	13,9 (11,0-17,9)	125,8 (90,0-203,7)	1,72±0,18	2,2	3

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

** Razão entre CL₅₀ EU (População sensível) e demais populações.

Tabela2. Valores de R² da Calibração, R² da Validação, erro da Calibração (EC), erro da Validação (EV) para as cinco populações de *G. molesta*.

Tratamento	R ² _C	E _C	R ² _V	E _V
Populações	0,98	0,059	0,91	0,535

FIGURAS

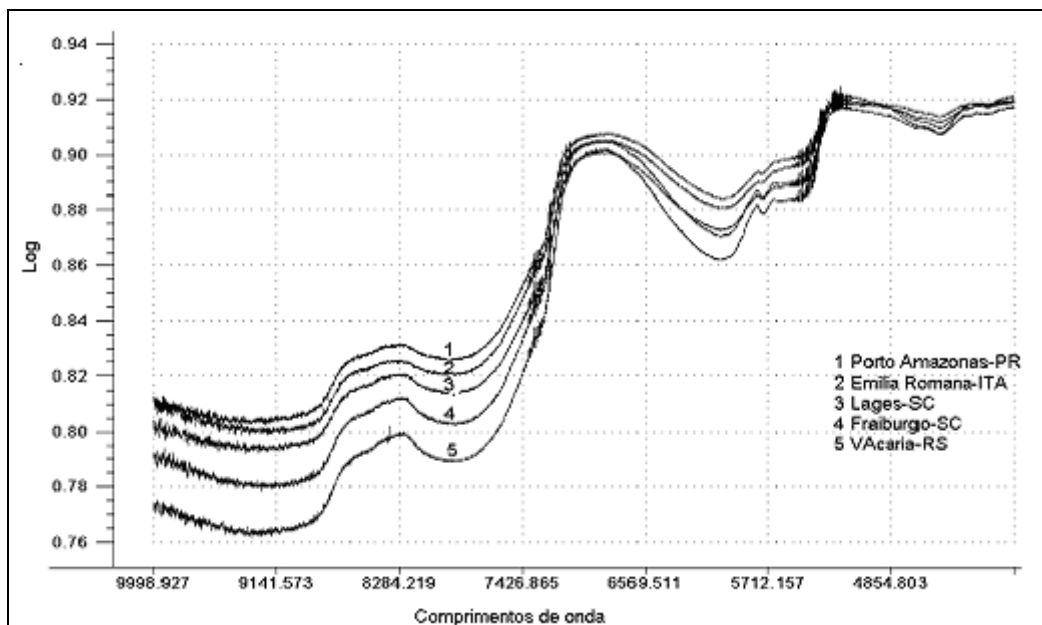


Figura 1. Espectros das cinco populações de *G. molesta* estudadas.

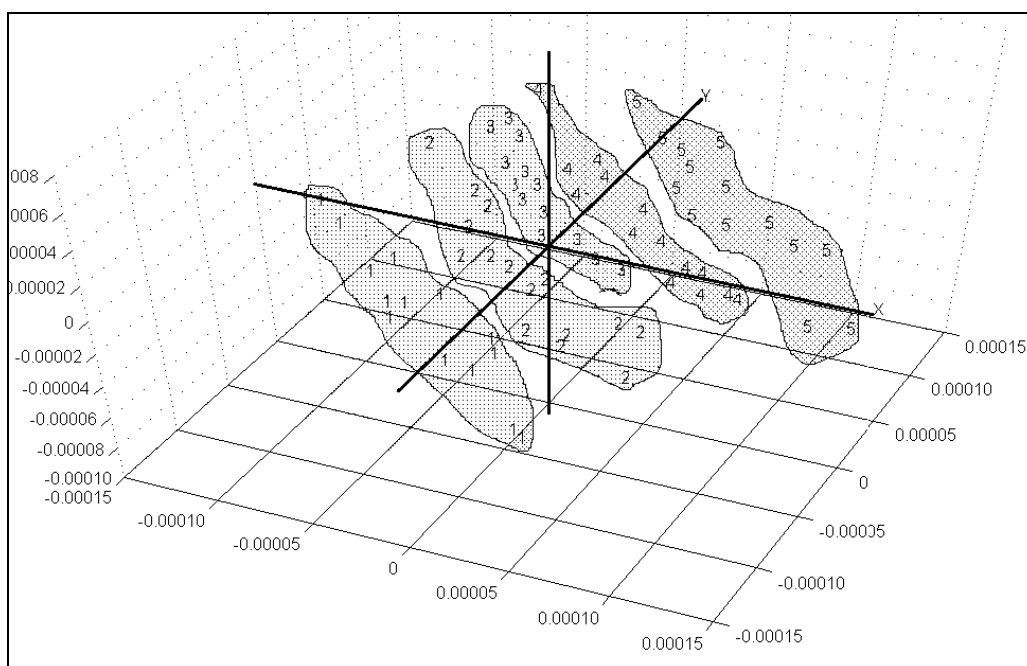


Figura 2. Distribuição de populações de *G. molesta* (1- Porto Amazonas-PR, 2- Lages-SC, 3- Emilia Romana-ITA, 4- Vacaria-RS, 5- Fraiburgo-SC) no PLS e NIRs. Valores dos eixos X = 38%, Y = 48%, Z = 9%.